

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-298447

(43)Date of publication of application : 28.10.2004

(51)Int.Cl.

A61L 27/00  
C12N 5/06

(21)Application number : 2003-096016

(71)Applicant : MENICON CO LTD

(22)Date of filing : 31.03.2003

(72)Inventor : YAMAMOTO KAZUAKI

## (54) CORNEA OR CONJUNCTIVA CURING CULTURED EPITHELIOCYTE SHEET AND ITS MANUFACTURING METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a cornea or conjunctive curing cultured sheet by which a high curing effect is expected by the metaplasia of conjunctiva epitheliocyte into a cornea epitheliocyte state through the use of epitheliocyte, and to provide its manufacturing method. SOLUTION: The cornea or conjunctiva curing cultured epitheliocyte sheet consists of a cultured conjunctiva which is obtained by sowing the conjunctiva epitheliocyte on a culture dish (1) or a substrate other than amnion (2) and culturing the conjunctiva epitheliocyte. The cornea or conjunctiva curing cultured sheet is produced by sowing the conjunctiva epitheliocyte on the culture dish (1) or the substrate other than amnion (2) and culturing the conjunctiva epitheliocyte, so as to obtain a cultured conjunctiva epitheliocyte sheet.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 10.01.2006

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-298447

(P2004-298447A)

(43) 公開日 平成16年10月28日(2004.10.28)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

A 6 1 L 27/00

C 1 2 N 5/08

F I

A 6 1 L 27/00

C 1 2 N 5/00

D

E

テーマコード (参考)

4 B 0 6 5

4 C 0 8 1

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2003-96016 (P2003-96016)

(22) 出願日 平成15年3月31日 (2003.3.31)

(71) 出願人 000138082

株式会社メニコン

愛知県名古屋市中区葵3丁目21番19号

(74) 代理人 100065226

弁理士 朝日奈 宗太

(74) 代理人 100098257

弁理士 佐木 啓二

(74) 代理人 100117112

弁理士 秋山 文男

(74) 代理人 100117123

弁理士 田中 弘

(72) 発明者 山本 和秋

愛知県春日井市高森台五丁目1番地10

株式会社メニコン総合研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結膜上皮細胞からなる角膜ないし結膜治療用培養シート、およびその作製方法

## (57) 【要約】

【課題】 結膜上皮細胞を用いることにより、結膜上皮細胞の角膜上皮細胞様への化生により高い治療効果が期待できる、角膜ないし結膜治療用培養シートおよびその作製方法を提供すること。

【解決手段】 結膜上皮細胞を(1)培養皿上または(2)羊膜以外の基質上に播種し、該結膜上皮細胞を培養することによって得られる培養結膜上皮細胞シートからなる、角膜ないし結膜治療用培養シート。結膜上皮細胞を(1)培養皿上または(2)羊膜以外の基質上に播種し、該結膜上皮細胞を培養することにより培養結膜上皮細胞シートを得ることからなる、角膜ないし結膜治療用培養シートの作製方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

結膜上皮細胞を（１）培養皿上または（２）羊膜以外の基質上に播種し、該結膜上皮細胞を培養することによって得られる培養結膜上皮細胞シートからなる、角膜ないし結膜治療用培養シート。

## 【請求項 2】

前記培養結膜上皮細胞シートが、前記結膜上皮細胞を  $1.8 \times 10^{-3}$  mol/L 未満のカルシウム塩を含有する基本培地において培養することによって得られる培養結膜上皮細胞シートである、請求項 1 記載の培養シート。

## 【請求項 3】

前記培養結膜上皮細胞シートが、酵素処理によって培養皿から剥離することによって得られる培養結膜上皮細胞シートである、請求項 1 記載の培養シート。

## 【請求項 4】

前記基質がフィブリンおよびコラーゲンのいずれか一つを含有してなる、請求項 1 記載の培養シート。

## 【請求項 5】

前記結膜上皮細胞が自己由来の結膜上皮細胞である、請求項 1 記載の培養シート。

## 【請求項 6】

結膜上皮細胞を（１）培養皿上または（２）羊膜以外の基質上に播種し、該結膜上皮細胞を培養することにより培養結膜上皮細胞シートを得ることからなる、角膜ないし結膜治療用培養シートの作製方法。

## 【請求項 7】

前記結膜上皮細胞を  $1.8 \times 10^{-3}$  mol/L 未満のカルシウム塩を含有する基本培地において培養することからなる、請求項 6 記載の培養シートの作製方法。

## 【請求項 8】

前記培養結膜上皮細胞シートを、酵素処理によって培養皿から剥離することからなる、請求項 6 記載の培養シートの作製方法。

## 【請求項 9】

前記基質がフィブリンおよびコラーゲンのいずれか一つを含有してなる、請求項 6 記載の培養シートの作製方法。

## 【請求項 10】

前記結膜上皮細胞が自己由来の結膜上皮細胞である、請求項 6 記載の培養シートの作製方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は角結膜疾患患者に利用される角膜ないし結膜治療用培養シートおよびその作製方法に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

角膜は眼球の前面に位置し、強膜とともに眼球の外壁を構成している。また、角膜は血管の存在しない透明な組織であり、外界からの光を眼内に透過、屈折させるレンズの機能を有するだけでなく、涙液とともに平滑な表面を形成することで、より良好な視力を得ることに貢献している。その角膜の最上層部に存在する角膜上皮の表層細胞の 1～2 層は、タイトジャンクションと呼ばれる特殊な接着構造で細胞間が密に閉じており、涙液側からの物質の浸透を防御するためのバリアー機能がある。このバリアー機能により、角膜内部への水溶性物質の透過を制限するとともに、細菌の侵入をも防いでいる。すなわち、角膜上皮細胞は角膜の透明性を維持し、眼球の恒常性を維持するために極めて重要な役割を果たしている。

## 【0003】

しかしこの角膜は疾患、不慮の事故などにより濁り、透明性が失われてしまう場合がある。このような角膜の濁りによる、永久的な視力低下および失明に対して角膜移植による治療が行なわれている。

#### 【0004】

難治性角膜上皮疾患患者に対する新規な治療法として培養角膜上皮シート移植が注目されている。通常、角膜上皮シートのような角膜上皮同等物を得るための手法は、自己またはドナー角膜から採取される角膜上皮細胞を様々な方法によって培養し、シート化して患者に移植するといった工程からなる。

#### 【0005】

たとえば、非特許文献1によると、自己の角膜上皮細胞を採取し、培養して、培養角膜上皮シートとすることが提案されている。しかしながら、現実的には自己の角膜上皮細胞が採取できるような片眼性の角膜疾患は稀であり、たとえ片眼性の角膜疾患の場合であっても、健康な目からの角質上皮細胞の採取する際のリスクを避ける傾向にある。したがって、培養角膜上皮シートを作製するための母細胞は、他人の角膜から採取される角膜上皮細胞を使用する場合が多い。

10

#### 【0006】

また、特許文献1においては、角膜上皮細胞の幹細胞組織である角膜輪部組織、もしくは結膜上皮細胞の幹細胞組織である結膜円縁部をスポンジ層および上皮層が除かれた羊膜上に付着させ、羊膜表面を覆うように上皮細胞を増殖させて得られる移植用細胞片が開示されている。しかしながら、角膜輪部組織または結膜円縁部などの上皮幹細胞組織および羊膜は、いずれも提供者の存在に依存するものであり、入手が困難であるという問題があった。また、仮に入手できたとしても、移植した細胞に対する免疫拒絶反応、または提供者由来の組織または羊膜からの感染といったリスクが存在する。

20

#### 【0007】

近年、眼科領域では、角膜と結膜の両方が同じ表面外胚葉由来の眼粘膜をもつことに着目し、角膜と結膜を一体化して“オキュラーサーフェス (Ocular surface)”とする概念が定着しつつある。また、結膜上皮が角膜上皮様へシフトする「化生」といった概念が一般的に知られつつある。

#### 【0008】

一方、特許文献2や、京都府立医科大学の木下茂教授らによる第26回角膜カンファレンスでの発表により、自己の口腔粘膜細胞から角膜上皮代替物が作製されることが開示されている。しかしながら、結膜上皮が角膜上皮様へシフトするといった化生を考慮した内容は開示されていない。

30

#### 【0009】

##### 【特許文献1】

特開2001-161353号公報

##### 【特許文献2】

特開2002-331025号公報

##### 【非特許文献1】

Pellegrini G, et al., Lancet Vol 394, p 990-993, 1997 Long-term restoration of damaged corneal surface with autologous cultivated corneal epithelium

40

#### 【0010】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は前記の問題を克服すべくなされたものであり、結膜上皮細胞を用いることにより、結膜上皮細胞の角膜上皮細胞様への化生により高い治療効果が期待できる、角膜ないし結膜治療用培養シートおよびその作製方法を提供することを目的とする。

#### 【0011】

##### 【課題を解決するための手段】

50

前記目的を達成するために鋭意検討を重ねた結果、結膜上皮細胞を角膜に移植した際、実際に結膜上皮細胞が角膜上皮細胞様に化生することを確認した。さらに、結膜上皮細胞を  $1.8 \times 10^{-3}$  mol/L 未満のカルシウム塩を含有する基本培地で培養することにより、角膜ないし結膜治療に適した培養結膜上皮細胞シートを得ることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0012】

すなわち、本発明は、結膜上皮細胞を（１）培養皿上または（２）羊膜以外の基質上に播種し、該結膜上皮細胞を培養することによって得られる培養結膜上皮細胞シートからなる、角膜ないし結膜治療用培養シートを提供する。

【0013】

前記角膜ないし結膜治療用培養シートにおいて、培養結膜上皮細胞シートは、結膜上皮細胞を  $1.8 \times 10^{-3}$  mol/L 未満のカルシウム塩を含有する基本培地において培養することによって得られる培養結膜上皮細胞シートであることが好ましい。

10

【0014】

前記角膜ないし結膜治療用培養シートにおいて、培養結膜上皮細胞シートは、酵素処理によって培養皿から剥離することによって得られる培養結膜上皮細胞シートであることが好ましい。

【0015】

さらに、前記基質はフィブリンおよびコラーゲンのいずれか一つを含有してなる基質であることが好ましい。

20

【0016】

前記角膜ないし結膜治療用培養シートにおいて、結膜上皮細胞は自己由来の結膜上皮細胞であることが好ましい。

【0017】

さらに、本発明は、結膜上皮細胞を（１）培養皿上または（２）羊膜以外の基質上に播種し、該結膜上皮細胞を培養することにより培養結膜上皮細胞シートを得ることからなる、角膜ないし結膜治療用培養シートの作製方法を提供する。

【0018】

前記角膜ないし結膜治療用培養シートの作製方法において、結膜上皮細胞を  $1.8 \times 10^{-3}$  mol/L 未満のカルシウム塩を含有する基本培地において培養することが好ましい。

30

【0019】

前記角膜ないし結膜治療用培養シートの作製方法において、培養結膜上皮細胞シートは、酵素処理によって培養皿から剥離することが好ましい。

【0020】

さらに、前記基質はフィブリンおよびコラーゲンのいずれか一つを含有してなる基質であることが好ましい。

【0021】

前記角膜ないし結膜治療用培養シートの作製方法において、結膜上皮細胞は自己由来の結膜上皮細胞であることが好ましい。

40

【0022】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の内容について詳細に説明する。

【0023】

本発明は、結膜上皮細胞を（１）培養皿上または（２）羊膜以外の基質上に播種し、該結膜上皮細胞を培養することによって得られる培養結膜上皮細胞シートからなる、角膜ないし結膜治療用培養シート、およびその作製方法である。本発明の培養シートは、角膜へ適用した場合に、該培養シート中の結膜上皮細胞が角膜上皮細胞様へ化生し、角膜の代替物として働き得ることを特徴とする角膜治療用培養シートである。

【0024】

50

「化生」とは、一般的に、分化・成熟した細胞がその再生過程において本来の分化の方向とは異なる別の分化の方向に変わることを用いる。本明細書において、「結膜上皮細胞の角膜上皮細胞様への化生」とは、結膜上皮細胞を角膜表面に適用した際に、結膜上皮細胞が角膜表面に生着し、角膜上皮細胞様へシフトし、角膜上皮のように透明化することを意味する。また、角膜上皮細胞様へ化生した結膜上皮細胞は、抗サイトケラチン3／12抗体（AE5）（シグマ社（SIGMA）製）を用いた蛍光免疫染色法において陽性を示す。抗サイトケラチン3／12抗体（AE5）とは、角膜上皮細胞に対するマーカーであるサイトケラチン（角膜上皮細胞に特異的に発現している細胞骨格タンパク質）と特異的に結合する抗体である。

#### 【0025】

本明細書において結膜上皮細胞とは、眼瞼後面を裏打ちする結膜（眼瞼結膜）に存在する上皮細胞、強膜前面を覆う結膜（眼球結膜）に存在する上皮細胞、およびその移行部の結膜円縁部に存在する結膜上皮細胞である。その中でも、結膜円縁部に存在する結膜上皮細胞が好ましい。結膜上皮細胞は、正常な結膜より直径2～10mmのシート状の結膜上皮組織の小片を採取することによって得ることができる。たとえば、結膜上皮細胞は、採取した結膜上皮組織から結膜上皮細胞を組織外へ伸展増殖させること（アウトグロース（out-growth））からなる外植片を用いた方法（イクスプラント（Explant）法）によって得ることができる。イクスプラント法においては、結膜上皮細胞とテノン嚢由来の線維芽細胞の2種類の細胞が結膜組織から2面に分かれてアウトグロースするため、たとえば滅菌されたスパーテルまたは細胞剥離用に市販されているスティックなどを用いて、線維芽細胞を剥ぎ取ることによって結膜上皮細胞を得ることができる。また、結膜上皮細胞は、ディスパーゼなどの酵素処理により結膜上皮組織から結膜上皮細胞を剥離させ、トリプシンにより分散させることからなる細胞懸濁液を用いた方法（サスペンション（Suspension）法）、またはインプレッションサイトロジーによって結膜表面から、ブラシまたはろ紙などによって直接細胞を収集する方法によって得ることもできる。結膜上皮組織は小片であればよいので、両眼性の角膜上皮疾患の患者自身からの採取も可能である。患者自身から結膜上皮細胞が得られた場合には、免疫拒絶反応を回避することができるため、結膜上皮細胞は自己由来の結膜上皮細胞であることが好ましい。

#### 【0026】

本発明において、前記結膜上皮細胞を培養するための培地としてはとくに限定されないが、基本培地（たとえば無機塩類やアミノ酸を含む）、または基本培地にウシ血清や脳下垂体分泌物などの動物由来栄養成分を添加した培地を使用することができる。

#### 【0027】

前記基本培地はカルシウム塩を含むことが好ましく、カルシウム塩としてはとくに限定されないが、塩化カルシウムまたはその水和物が好ましい。前記培地に含有されるカルシウム塩の濃度は、 $1.8 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 未満であることが好ましい。 $1.8 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 未満である場合、細胞の分化状態が過度に進まないことが考えられ、細胞形態が敷石状である結膜上皮細胞（たとえば図6）が得られる傾向がある。 $1.8 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 以上である場合には、結膜上皮細胞は早期に老化が進行し、細胞形態が線維芽細胞状である結膜上皮細胞（たとえば図7）が得られる傾向がある。

#### 【0028】

本明細書において培養皿はとくに限定されないが、細胞培養に使用できる市販の培養皿を使用することができる。たとえば、温度に応じて培養シートとの接着強度などを調節できるような温度応答性培養皿などを使用することができる。

#### 【0029】

本明細書において基質は、移植用として安全であり、かつ細胞の接着性が好ましく、さらには細胞層を運ぶ支持体として使用しやすいものが挙げられる。前記の観点から、本発明において使用される基質として、生分解性材料、ポリペプチドおよび糖質からなる群から選ばれる少なくとも一つを含有してなる基質が挙げられる。生分解性材料としては、とくに限定されないが、フィブリン、コラーゲン、ゼラチン、ヒアルロン酸およびコンドロイ

10

20

30

40

50

チン硫酸などがあげられる。この中でも、より生分解性および生体適合性に優れ、細胞の足場となりうるということが知られているフィブリンまたはコラーゲンが好ましく、コラーゲンの一種であるアテロコラーゲンが最も好ましい。羊膜は、眼科領域において移植の際、使用される基質の1つであるが、提供者の存在に依存するものであるため入手が困難であり、入手できたとしても、免疫拒絶反応、羊膜からの感染といったリスクが存在することから、基質として羊膜を使用することは望ましくない。基質は、たとえば培養皿の内部に設置して使用することができる。たとえば、図1に示すように、基質2は支柱5が配された円筒4の片面に接着し、培養皿1aに設置して使用することができる。図1においては、基質2を接着した面が培養皿1aの底から約1mmの高さに位置するように支柱5は円筒4に配されている。図1に示すように、基質を設置して培養結膜上皮細胞シートを作製した場合には、たとえばナイフなどを用いて適当な大きさに培養結膜上皮細胞シートを切断し、ピンセットで取り出すことができる。

10

#### 【0030】

本明細書において培養結膜上皮細胞シートを得るためには、まず前記培養皿上または培養皿の内部に設置された基質上に、結膜上皮細胞を、たとえば、 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^6$  細胞個/cm<sup>2</sup>の細胞密度、好ましくは $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^5$  細胞個/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播種する。ついで前記培地を培養皿に添加し、20～40℃、好ましくは30～38℃で、3～30日間、好ましくは7～21日間培養することにより培養結膜上皮細胞シートを得ることができる。

#### 【0031】

20

培養結膜上皮細胞シートは、当技術分野における既知の方法によって培養皿から剥離することによって得ることができる。たとえば、培養結膜上皮細胞シートは、培養皿から培地を除去し、カルシウム塩を含まないリン酸緩衝液で洗浄したのち、該培養皿に酵素溶液（たとえばディスパーゼ溶液）を加え、37℃で5～30分処理することによって容易に培養皿から剥離することができる。また、剥離の際にはピンセットまたは支持膜を用いて剥離を促してもよい。剥離した培養結膜上皮細胞シートは細胞培養液またはリン酸緩衝液で洗浄することが好ましい。培養結膜上皮細胞シートが、培養皿の内部に設置された基質上に結膜上皮細胞を播種することにより作製された場合には、とくに酵素などの化学処理を施すことは必要なく、容易に培養皿から剥離することができる。

#### 【0032】

30

前記の方法によって得られた培養結膜上皮細胞シートは、角膜および結膜の治療に使用し得る。前記培養結膜上皮細胞シートは、たとえば化学薬品や火傷などによる角膜上皮障害、スティーブンス・ジョンソン症による角膜上皮障害および眼類天疱瘡などの角膜疾患に使用することができ、角膜上皮細胞および／または角膜輪部の状態が完全に破壊されている角膜疾患に対しても有効である。培養結膜上皮細胞シートを角膜創傷部に移植した場合、培養結膜上皮細胞シートは、角膜表面に生着し、角膜上皮のように透明化することにより正常角膜上皮として機能し、角膜創傷部は治療される。また、前記培養結膜上皮シートは、たとえば化学薬品や火傷などによる結膜上皮障害、スティーブンス・ジョンソン症による結膜上皮障害などの結膜疾患に使用することもできる。培養結膜上皮細胞シートを結膜に移植した場合、培養結膜上皮細胞シートは結膜表面に生着することにより正常結膜として機能し、創傷部が治癒される。

40

#### 【0033】

つぎに、本発明の角膜ないし結膜治療用培養シートを以下の実施例にもとづいてさらに詳細に説明するが、本発明はかかる実施例のみに限定されるものではない。

#### 【0034】

##### 【実施例】

##### 実施例1

##### <基質を用いる培養結膜上皮細胞シートの作製>

健常で眼疾患歴のない日本白色ウサギの眼表面の結膜より、直径2～3mmのシート状小片を麻酔下にて切除し、6穴プレート（直径約3.5cm、ベクトン・ディッキンソン社

50

製)に静置した(以下、実施例1において、6穴プレートを培養皿とする)。3.  $0 \times 10^{-5}$  mol/Lの塩化カルシウムを含有するMCDB153培地(GIBCO社製)に10%ウシ血清を添加して得られた培地1 mLを該培養皿に加え、シート状小片を37℃で1週間培養した。培地は、2日おきに交換した。ついで、10%ウシ血清を添加された3.  $0 \times 10^{-5}$  mol/Lの塩化カルシウムを含有する新鮮なMCDB153培地2 mLと交換したのち、シート状小片を37℃でさらに1週間培養した。さらなる1週間の培養においても、培地は2日おきに交換した。

#### 【0035】

合計2週間の培養ののち、結膜組織から2面に分かれて伸展増殖した2種類の細胞(結膜上皮細胞とテノン嚢由来の線維芽細胞)のうち、滅菌したスパーテルで線維芽細胞を剥ぎ取り、結膜の小片から結膜上皮細胞を入手した。

10

#### 【0036】

得られた結膜上皮細胞を、図1に示すように、培養皿に設置されたアテロコラーゲン膜上に1.  $6 \times 10^4$  細胞個/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播種した。ついで、10%ウシ血清を添加された3.  $0 \times 10^{-5}$  mol/Lの塩化カルシウムを含有する新鮮なMCDB153培地を前記培養皿に加え、結膜上皮細胞を1週間、37℃に設定したCO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養した。培地交換は2日に一度行なった。その結果、培養結膜上皮細胞シートが得られた。得られた培養結膜上皮細胞シートを観察したところ、アテロコラーゲン膜表面は結膜上皮細胞で完全に被覆されていることが確認された。

#### 【0037】

20

#### 参考例1

<結膜上皮細胞の角膜上皮細胞への化生確認試験>

健常で眼疾患歴のない日本白色ウサギの眼表面の眼球結膜より、直径5~6 mmの円形シート状の結膜上皮組織片を麻酔下にて切除し、ついで、同眼の角膜中央部の角膜実質内に該結膜上皮組織片を埋植し、縫合により固定した。図2に結膜上皮組織片の埋植から24時間後の前眼部の様子を示す。

#### 【0038】

結膜上皮組織片の埋植から3週間ののち、縫合した糸の抜糸を行なった。図3に抜糸から2週間後の前眼部の様子を示す。図3に示すように、結膜上皮組織片が埋植された角膜において、血管浸入や混濁は認められなかった。図4には抜糸から2週間後に摘出された角膜の結膜上皮組織片の埋植部分のエオジン・ヘマトキシリン染色像を示す。図4で示されるように、埋植された結膜上皮組織片中の結膜上皮細胞がエオジン・ヘマトキシリンによって染色されたことから、血液からの栄養分の供給がなくても、結膜上皮細胞は角膜実質において生存し、角膜実質層に接着し、増殖し伸展できることが判明した。図5には抜糸から2週間後に摘出された角膜の結膜上皮組織片の埋植部分の抗サイトケラチン3/12抗体(AE5)による蛍光免疫染色像を示す。通常、結膜上皮細胞は抗サイトケラチン3/12抗体(AE5)に対して陰性であるが、図5より、埋植された結膜上皮組織片中の結膜上皮細胞は角膜上皮細胞と同様に、抗サイトケラチン3/12抗体(AE5)に対して陽性を示した。したがって、結膜上皮細胞は角膜実質内に挿入されることにより角膜上皮細胞様の細胞に化生することが分かった。

30

#### 【0039】

#### 参考例2

<結膜上皮細胞の初代培養>

健常で眼疾患歴のない日本白色ウサギの眼表面の結膜より、直径2~3 mmのシート状小片を麻酔下にて切除し、6穴プレート(直径約3.5 cm、ベクトン・ディッキンソン社製)に静置した(以下、参考例2において、6穴プレートを培養皿とする)。3.  $0 \times 10^{-5}$  mol/Lの塩化カルシウムを含有するMCDB153培地(GIBCO社製)へ10%ウシ血清を添加して得られた培地1 mLを該培養皿に加え、シート状小片を37℃で1週間培養した。培地は、2日おきに交換した。ついで、10%ウシ血清を添加された3.  $0 \times 10^{-5}$  mol/Lの塩化カルシウムを含有する新鮮なMCDB153培地2 mL

40

50



Lと交換したのち、シート状小片を37℃でさらに1週間培養した。さらなる1週間の培養においても、培地は2日おきに交換した。

#### 【0040】

合計2週間の培養ののち、結膜組織から2面に分かれて伸展増殖（アウトグロース）した2種類の細胞（結膜上皮細胞とテノン嚢由来の線維芽細胞）のうち、線維芽細胞を滅菌したスパーテルで剥ぎ取り、結膜の小片から結膜上皮細胞を入手した。図6に、結膜組織からアウトグロースした結膜上皮細胞の位相差顕微鏡像を示す。図6に示すように、敷石状の形態の結膜上皮細胞が観察された。

#### 【0041】

##### 参考例3

10

##### <結膜上皮細胞の初代培養>

健常で眼疾患歴のない日本白色ウサギの眼表面の結膜より、直径2～3mmのシート状小片を麻酔下にて切除し、6穴プレート（直径約3.5cm、ベクトン・ディッキンソン社製）に静置した（以下、参考例3において、6穴プレートを培養皿とする）。 $1.8 \times 10^{-3}$  mol/Lの塩化カルシウムを含有するDMEM培地（GIBCO社製）へ10%ウシ血清を添加して得られた培地1mLを該培養皿に加え、37℃で1週間培養した。培地は、2日おきに交換した。ついで、10%ウシ血清を添加された $1.8 \times 10^{-3}$  mol/Lの塩化カルシウムを含有する新鮮なDMEM培地2mLと交換したのち、シート状小片を37℃でさらに1週間培養した。さらなる1週間の培養においても、培地は2日おきに交換した。

20

#### 【0042】

図7に、合計2週間の培養ののち結膜組織からアウトグロースした結膜上皮細胞の位相差顕微鏡像を示す。図7に示すように、線維芽細胞状の形態の結膜上皮細胞が観察された。

#### 【0043】

##### 【発明の効果】

本発明により、正常な結膜組織より直径2～10mmの小片を入手することができれば、角膜ないし結膜の治療に有用な培養結膜上皮細胞シートを作製することができる。また、 $1.8 \times 10^{-3}$  mol/L未満のカルシウム塩を含有する基本培地で結膜上皮細胞を培養することにより、角膜ないし結膜の治療に有用な培養結膜上皮細胞シートを得ることができる。とくに、基質としてアテロコラーゲンを使用した場合には、操作も容易であり、免疫原性も極めて低いため有用である。また、患者の角膜上皮が欠損している場合であっても、結膜上皮細胞は角膜上皮細胞に比べ容易に入手できる。このように得られた培養結膜上皮細胞シートを角膜へ適用した場合、培養結膜上皮細胞シート中の結膜上皮細胞は角膜上皮細胞様に化生することによって、培養結膜上皮細胞シートは正常角膜上皮として機能するため、角膜の治療に有用である。また、前記結膜上皮細胞シートは、角膜上皮細胞および/または角膜輪部の状態が完全に破壊されている角膜疾患に対しても有効である。前記培養結膜上皮細胞シートを結膜へ適用した場合、培養結膜上皮細胞シートは結膜表面に生着し、正常結膜として機能するため、結膜の治療に有用である。

30

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の角膜ないし結膜治療用培養シート作製の際に使用する培養皿の一実施態様を示す概略図である。

40

【図2】図2は、結膜上皮組織片を埋植してから24時間後の前眼部を示す。

【図3】図3は、結膜上皮組織片を埋植してから5週間後の前眼部を示す。

【図4】図4は、結膜上皮組織片を埋植してから5週間後に角膜から摘出された角膜のエオジン・ヘマトキシリン染色による組織染色像である。

【図5】図5は、結膜上皮組織片を埋植してから5週間後に角膜から摘出された角膜の抗サイトケラチン3/12抗体（AE5）による蛍光免疫染色による組織染色像を示す。

【図6】図6は、参考例2で結膜組織からアウトグロースした結膜上皮細胞の位相差顕微鏡像である。

【図7】図7は、参考例3で結膜組織からアウトグロースした結膜上皮細胞の位相差顕微

50

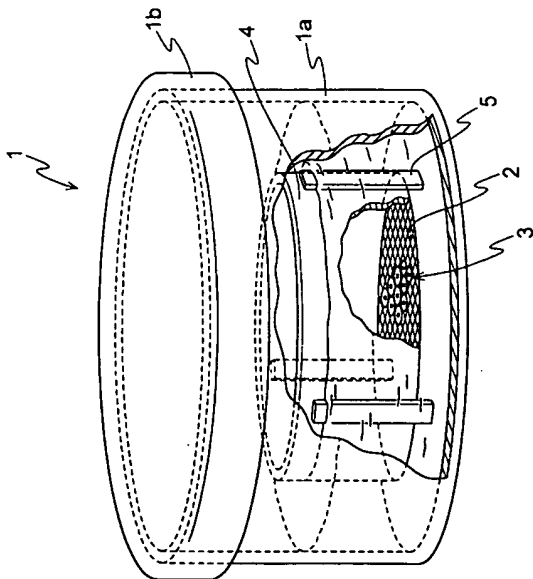
鏡像である。

【符号の説明】

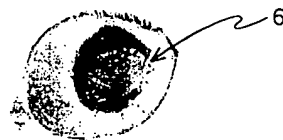
- 1 培養器
- 1 a 培養皿
- 1 b 蓋
- 2 アテロコラーゲン
- 3 結膜上皮細胞
- 4 円筒
- 5 支柱
- 6 結膜上皮組織片
- 7 角膜上皮層
- 8 角膜内皮層
- 9 角膜実質

10

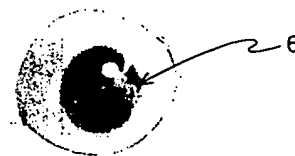
【図 1】



【図 2】



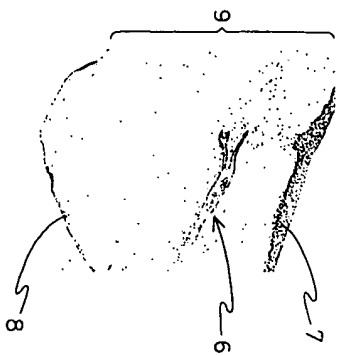
【図 3】



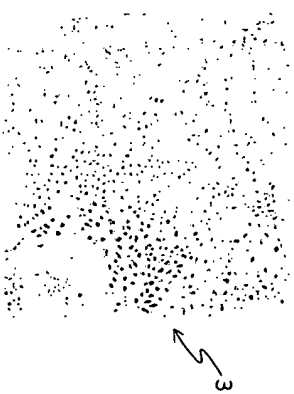
(10)

JP 2004-298447 A 2004.10.28

【図 4】



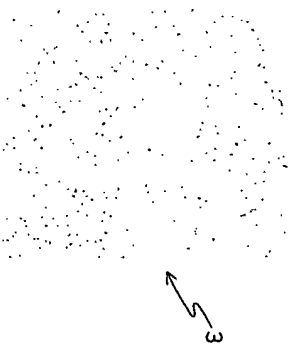
【図 6】



【図 5】



【図 7】



---

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B065 AA90X BA30 BB01 BB02 BB25 BC03 BC07 BC41 BC46 CA43  
CA44

4C081 AB21 BA14 BB08 CD111 CD121 CD34 DA02 EA02 EA03

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**